

金沢大学がん研究所共同研究成果報告書

平成 23 年 4 月 22 日提出

対象研究テーマ：in vitro がん幹細胞モデル系の開発に関する研究

研究期間：2010 年 4 月 8 日～2011 年 3 月 31 日

研究題目：SMS 抑制による細胞死誘導セラミド・シグナル増強を介した ATM 遺伝子欠損マウスにおけるリンパ腫発症機構の制御

研究代表者：鳥取大学医学部 教授 岡崎俊朗

研究成果の概要：

ataxia telangiectasia mutated (ATM) 遺伝子欠損による腫瘍発生時のセラミド・シグナルの関与を申請し検討した。ATM 欠損マウスに p16/Ink4a 欠損マウスを交配することでダブル KO マウスを作成し悪性リンパ腫発生を試みたが、発生効率が非常に低く、このダブル KO マウスに SMS 1-KO マウスを掛け合わせて、トリプル KO マウスを作成することが困難なことが判明した。その後、マウス腫瘍発生モデルとして Rb 遺伝子欠損マウスにおいて、効率的に腺癌が発症するモデルを作成できたため、今後、このマウスの系に関して SMS 1 欠損マウスを掛け合わせることで、セラミド産生の抑制が誘導され腺癌腫瘍細胞の増大を阻害できるかについて検討したい。

研究分野：脂質生化学 癌増殖抑制

キーワード：スフィンゴミエリン セラミド ATM

1. 研究開始当初の背景

スフィンゴ脂質セラミドは細胞死誘導脂質として、細胞膜の解剖学的成分として機能するのみでなく細胞機能を制御するメディエーターであることが、Hanuun 並びに岡崎らのグループにより初めて報告された (Okazaki T., et al. *J. Biol. Chem.*, 264: 19076-19080, 1989)。

一方、ataxia telangiectasia mutated (ATM) 遺伝子は AT の原因遺伝子として同定され、その欠損は DNA 二重鎖切断 (DSBs) を中心とする DNA 損傷の修復機構の破綻を生じることが知られている。放射線により ATM 欠損細胞は細胞死誘導を亢進し、その際にセラミド・シグナルが活性化することが報告され、そのセラミド量増加機構として ATM によるセラミド産生酵素 (CS) 抑制の解除が示されている (Oncogene (2003) 22, 8645-8652)。しかしながら、腫瘍増殖における ATM を介したセラミド制御については不明の点が多い

2. 研究の目的

今回、より病態モデルに近づいて ATM と細胞死誘導セラミド・シグナルの関係につい

て解析するために、セラミド産生抑制効果のある SMS 欠損状態が ATM/INK4a 欠損マウスにおける悪性リンパ腫発症を抑制できるかについて検討し、その分子機構については ATM/INK4a 欠損マウス胎児線維芽細胞 (MEF) を用いて ATM の下流シグナルにおけるセラミド産生機構 (SMS や CS) の制御について解析する

3. 研究の方法

(1) ATM ノックアウトマウスの作成とその表現型

(2) p16/Ink4a 欠損マウスの作成とその表現型

(3) ATM-p16/Ink4a ダブルノックアウトマウスの作成とその予想表現型

これらの知見と予測から、細胞老化と DNA 損傷応答の双方が抑制される p16/Ink4a-ATM ダブルノックアウトマウスでは、ATM 欠損が原因となる胸腺リンパ腫の頻度が上昇し、悪性度も高まると予想している。結果として、このマウスは、悪性リンパ腫発症のモデルマウスとしての応用が期待される。

(4) SMS 1, 2 KO マウスと p16/Ink4a-ATM

ダブルノックアウトマウスのトリプル KO マウスの作成と悪性リンパ腫発症における SMS 欠損によるセラミド産生増強の影響

(5) p16/Ink4a-ATM ダブルノックアウトマウス由来 MEF を用いてセラミド産生機構の分子制御

4. 研究成果

ataxia telangiectasia mutated (ATM) 遺伝子欠損による腫瘍発生時のセラミド・シグナルの関与を申請し検討した。ATM 欠損マウスに p16/Ink4a 欠損マウスを交配することでダブル KO マウスを作成し悪性リンパ腫発生を試みたが、発生効率が非常に低く、このダブル KO マウスに SMS 1-KO マウスを掛け合わせて、トリプル KO マウスを作成することが困難なことが判明した。今後、異なる遺伝子改変マウスを用いて腫瘍形成を促進して、その条件において、SMS-KO によるセラミドシグナル増加が腫瘍増生抑制に寄与するかについて検討することが必要と思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

Elodie Lafont, K. Kitatani, Bruno Ségui and Okazaki T. Regulation of death and growth signal on the plasma membrane by sphingomyelin synthesis in hematological malignancy. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 2010 in press

Huang C.R., Jin Z., S., Dong L., Tong X., P., Yue S., Kaminami T., Sawaki T., Sakai T., Miki M., Iwao H., Nakajima A., Masaki Y., Fukushima Y., Tanaka M., Fujita Y., Nakajima H., Okazaki T. and Umehara H. Cisplatin Augments FAS-mediated Apoptosis through Lipid Rafts. *Anticancer Res.* 30: 2065-2072, 2010

Fujiwara K., Kitatani K., Fukushima K., Yazama H., Kikuchi M., Igarashi Y., Kitano H., and Okazaki T. Inhibitory effects of dietary glucosylceramide on squamous cell carcinoma of the head and neck in NOD/SCID mice. *Int. J. Clin. Oncol.* DOI: 10.1007/s10147-010-0141-y, 2010

Lafont R., Milhas D., Carpentier S., Garcia V., Jin Z.X., Umehara H., Okazaki T.

Schulze-Osthoff K., Levade T., Benoist H. and Ségui B. Caspase-mediated inhibition of sphingomyelin synthesis is involved in FASL-triggered cell death. *Cell Death Diff.* 17(4):642-54, 2010

[学会発表] (計 2 件)

Okazaki T., SMS1, but not SMS2, regulates intracellular traffic and recycling pathway in cell death and proliferation. Gordon Conference, Glycolipid and sphingolipid, Ventura, USA, Feb. 6-10, 2010 (invited)

Okazaki T., Abo Bakr Abdel Shakor, Taniguchi M., Asano S., Hashimoto M., Sasaki E., Umehara H. and Kitatani K. Sphingomyelin and cellular trafficking: role of sphingomyelin synthase 1 (SMS1) in the transferrin itinerary and the proliferation of lymphoma cells. The 27th Naito Conference, Sapporo, Japan, Jun 29-July 2, 2010

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

小野薬品工業 (株) との共願

「sphingomyelin synthase 阻害剤の拘束スクリーニング法」

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳥取大学医学部・教授 岡崎俊朗

(2) 研究分担者

鳥取大学医学部・助教 北谷和之

鳥取大学医学部・研究員 谷口真

鳥取大学医学部・研究員 橋本真由美

鳥取大学医学部・研究員 浅野智志

(3) 本研究所担当者

腫瘍分子生物学・教授 高橋智聡